

(4)

# Rola apoptozy w indukowaniu zmian ocznych u pacjentów z mukowiscydozą

## *The role of apoptosis in induction ocular changes in patients with cystic fibrosis*

Małgorzata Mrugacz<sup>1</sup>, Beata Żelazowska-Rutkowska<sup>2</sup>, Alina Bakunowicz-Łazarczyk<sup>1</sup>,  
Jolanta Wysocka<sup>2</sup>, Maciej Kaczmarek<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Z Kliniki Okulistyki Dziecięcej Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Alina Bakunowicz-Łazarczyk

<sup>2</sup> Z Zakładu Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatrycznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jolanta Wysocka

<sup>3</sup> Z III Kliniki Chorób Dzieci Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Maciej Kaczmarek

### Summary:

**Purpose:** To evaluate the concentration of sFas in tear film of cystic fibrosis patients.

**Material and methods:** Tear samples were collected from 20 patients with cystic fibrosis and 20 patients from control group. The sFas levels were determined by immunoenzymatic assay ELISA.

**Results:** We found statistically increased levels of sFas in tear film of patients with cystic fibrosis compared with control group.

**Conclusions:** Apoptosis may play role in the pathogenesis of ocular changes in cystic fibrosis patients. The above results are important for the choice of the treatment of dry eye syndrome in patients with cystic fibrosis.

### Słowa kluczowe:

mukowiscydoza, apoptoza, sFas.

### Key words:

cystic fibrosis, apoptosis, sFas.

Apoptoza, programowana śmierć komórki, to proces, który w ostatnich latach budzi szczególne zainteresowanie coraz większej liczby naukowców i klinicystów. Poznanie go pozwala bowiem na zrozumienie wielu zjawisk fizjologicznych i patologicznych, których wcześniej nie sposób było właściwie zinterpretować. O doniosłości i wielkim znaczeniu badań nad apoptozą świadczy przyznanie Nagrody Nobla za rok 2002 w dziedzinie fizjologii i medycyny. Otrzymał ją wspólnie Brytyjczyk Sydney Brenner i John E. Sulston oraz Amerykanin H. Robert Horvitz za odkrycia dotyczące udziału genów w regulacji rozwoju narządów i programowanej śmierci komórki.

Dzisiaj wiemy, że apoptoza ma charakter uniwersalny, a sygnał do niej może być uruchomiony praktycznie w każdej komórce naszego organizmu. Stąd oczywisty wniosek, że zjawisko to może mieć ogromne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. W chorobach nowotworowych, autoimmunologicznych i alergicznych obserwuje się zahamowanie zdolności niektórych komórek do apoptozy, w innych zaś – takich jak zakażenie HIV, przewlekłe zapalenie wątroby typu B i C, zawał serca oraz choroby degeneracyjne ośrodkowego układu nerwowego – mamy do czynienia ze zdecydowanym nasileniem tego zjawiska (1). Podkreśla się również udział apoptozy w chorobach genetycznych, między innymi w mukowiscydozie (2). Co prawda dominujące dolegliwości w tym schorzeniu dotyczą układu oddechowego i pokarmowego, jednak coraz częściej zwraca się uwagę na występowanie objawów ze strony narządu wzroku, głównie pod postacią zespołu suchego oka (3, 4). Jak wiadomo, zespół suchego oka stanowi znamieny przykład udziału apoptozy w patogenezie chorób dotyczących oka (5-7).

Szczególną uwagę w indukcji apoptozy przypisuje się grupie receptorów należących do rodziny TNF (Tumor Necrosis Factor), w skład której wchodzi m.in. receptor Apo-1 (Fas/ CD95) (8). Fas jest receptorem promującym śmierć komórki. Aktywowanie tego receptora przez komplementarną cząsteczkę Fas ligand (FasL) lub antagonistyczne przeciwciała zapoczątkowuje wewnątrzkomórkowy szlak przemian (9). Cząsteczka Fas jest receptorem błonowym typu I, który może również występować w formie rozpuszczalnej (sFas), m.in. w surowicy krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym i łzach (10-11). Po związaniu z ligandem dochodzi do oligomeryzacji cząsteczek receptora, a następnie sygnał przekazywany jest przez ich wewnątrzcytoplazmatyczną część, zwaną domeną śmierci DD (Death Domain). Powoduje to aktywację wielu białek adaptorowych i kaskady kaspaz, czyli fazę wykonawczą apoptozy. Końcowym etapem kaskady kaspaz jest fragmentacja jądrowego DNA (12).

**Celem pracy** była ocena stężenia rozpuszczalnego Fas (soluble Fas, sFas) w płynie łzowym pacjentów z mukowiscydozą.

### Material i metody

Badania przeprowadzono u 11 dziewczynek i 9 chłopców w wieku od 8 do 21 lat (średnia wieku  $14,03 \pm 3,56$ ) z rozpoznaną mukowiscydozą, objętych opieką III Kliniki Chorób Dzieci AM w Białymstoku. Grupę kontrolną stanowiło 10 dziewczynek i 10 chłopców w wieku od 7 do 20 lat, średnia wieku  $13,55 \pm 4,01$ . W trakcie badań dwoje dzieci z mukowiscydozą przyjmowało doustnie antybiotyki, u wszystkich zaś zastosowano suplementację witaminy A.

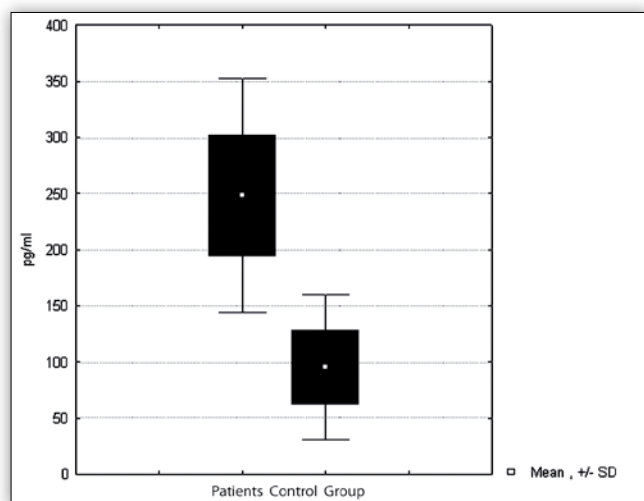
U wszystkich badanych wykonano badania pediatryczne i okulistyczne. W badaniu pediatrycznym uwzględniono cztery parametry kliniczne: dane z wywiadu, zmiany w płucach stwierdzone badaniem fizykalnym, wzrastanie i odżywianie oraz zmiany radiologiczne w płucach. Badanie okulistyczne obejmowało badanie odcinka przedniego i dna oczu.

W celu oznaczenia stężenia sFas w płynie łzowym od wszystkich badanych pobrano łzy dzięki zastosowaniu szklanych kapilar, które umiejscawiano w kącie zewnętrznym szpary powiekowej (zgoda Komisji Bioetycznej nr R-I-003/32/2003). Łzy pobierano z obojga oczu, a następnie delikatnie mieszano i zamrażano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Do oznaczeń wykorzystano metodę immunoenzymatyczną ELISA z zastosowaniem odpowiedniego zestawu diagnostycznego (Quantikine, R&D Systems). Wykorzystano 96-dółkową płytkę opłaszczoną monoklonalnymi przeciwciałami anti-sFas, do której odpipetowano odpowiednią objętość przygotowanych wcześniej standardów oraz próbek płynów łzowych pacjentów. Płytkę inkubowano 2 godziny, następnie całość poddano płukaniu roztworem płuczającym i ponownie inkubowano wraz z roztworem koniugatu. Po ponownym płukaniu do dołków dodano enzym (TBM), co powodowało powstanie barwnego produktu wprost proporcjonalnego do poziomu sFas w badanej próbce. Intensywność zabarwienia mierzono fotometrycznie w czytniku ELISA (ANTHOS), przy długości fali 450 nm. Wszystkie procedury dotyczące czasu inkubacji, rozcieńczeń standardów i liczby płukań wykonano zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu.

Zgodność zbioru badanych wartości z rozkładem normalnym badano za pomocą testu SHAPIRO-WILKA. Porównania stężenia sFas w płynie łzowym u pacjentów z mukowiscydozą i w grupie kontrolnej dokonano za pomocą testu t-Studenta. Poziom istotności przyjęto dla  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Stężenie sFas w łzach pacjentów z mukowiscydozą wynosiło od 182,5 pg/ml do 370,14 pg/ml, średnio 248,63 pg/ml  $\pm$  53,19. W grupie kontrolnej stężenie sFas wahało się między



Ryc. 1. Stężenie sFas w płynie łzowym pacjentów z mukowiscydozą i w grupie kontrolnej (pg/ml).

Fig. 1. Stężenie sFas w płynie łzowym pacjentów z mukowiscydozą i w grupie kontrolnej (pg/ml).

28,28 pg/ml a 173,94 pg/ml, średnio 95,69 pg/ml  $\pm$  33,07. Analiza statystyczna wykazała różnice statystycznie między stężeniem sFas w płynie łzowym pacjentów z mukowiscydozą a stężeniem sFas w łzach osób badanych z grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ). Uzyskane wyniki prezentuje rycina 1.

## Omówienie

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że stężenie sFas w płynie łzowym u pacjentów z mukowiscydozą jest znacząco wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Podwyższone stężenie sFas w płynie łzowym u pacjentów z mukowiscydozą wskazuje na możliwość indukowania zmian ocznych w przebiegu mukowiscydozy poprzez apoptozę.

Publikacje z ostatnich lat wskazują na dysfunkcję apoptozy w mukowiscydozie. Gottlieb i wsp. w badaniach eksperymentalnych na myszach wykazali „oporność” w inicjacji apoptozy zmutowanych komórek nabłonka sutka (13), Maiuri i wsp. zaś obserwowali wzrost fragmentacji DNA oraz ekspresji Fas i Fas ligand w enterocytach pacjentów chorych na mukowiscydozę, co może sugerować możliwą rolę ligacji Fas w indukcji apoptozy (14). Interakcje Fas–Fas ligand odgrywają prawdopodobnie rolę w aktywacji drogi apoptotycznej również w komórkach nabłonkowych dróg oddechowych (2).

Z drugiej strony należy zwrócić uwagę na to, że ekspresja Fas ligand może mieć wpływ na utrzymanie stanu uprzywilejowania immunologicznego w takich miejscach organizmu jak na przykład oko (15), a wiadomo, że istotną rolę w fenomenie zjawiska apoptozy odgrywa system Fas–Fas ligand. Badania *in vivo* i *in vitro* wykazały, że w zespole suchego oka dochodzi do zwiększonej ekspresji markerów apoptozy, przy czym interferon-gamma (IFN-gamma) może stymulować ekspresję Fas, jak i indukować komórki spojówki do ekspresji antygenów MHC klasy II, które odgrywają kluczową rolę w inicjacji odpowiedzi zapalnej. Aktywność proapoptotyczna IFN-gamma towarzysząca ekspresji cząstek zapalnych pozwala wyjaśniać współistnienie apoptozy i zapalenia w powstawaniu zmian ocznych w narządzie wzroku (16-19). Obserwacje te mogą stanowić podstawę nowego poglądu na temat patogenezy powyższych zmian, a także przyczynić się do zweryfikowania dotychczasowego stanu wiedzy odnośnie udziału apoptozy w powstawaniu lokalnych zmian u pacjentów z mukowiscydozą, tym bardziej, że dotychczas żadnych badań dotyczących stężenia sFas w płynie łzowym u pacjentów z mukowiscydozą nie przeprowadzono.

## Wnioski

1. Przeprowadzone badania sugerują, że apoptoza może stanowić istotne ogniwo patogenezy zmian ocznych w przebiegu mukowiscydozy.
2. Możliwość regulacji apoptozy może być istotna w leczeniu zespołu suchego oka u pacjentów chorujących na mukowiscydozę.

## Piśmiennictwo:

1. Klupa T.: *Apoptoza – od teorii do praktyki*. Przegląd Lekarski, 1998, 55, 528-531.
2. Durieu I., Amsellem C., Paulin C., Chambe M., Bienvenu J., Bellon G., Pacheco Y.: *Fas and Fas ligand expression in cystic fibrosis airway epithelium*. Thorax, 1998, 54, 1093-1098.

3. Mrugacz M., Minarowska A., Bakunowicz-Lazarczyk A., Żywałańska N.: *Zespół suchego oka u dzieci z mukowiscydozą*. Med. Wieku Rozwoj., 2004, 8, 865–870.
4. Mrugacz M., Minarowska A.: *Objawy oczne w zwłóknieniu torbielowatym*. Klin. Oczna, 2002, 104, 418-20.
5. Tsubota K., Fujita H., Tadano K., Onoda N., Tsuzaka K., Takeuchi T.: *Abnormal expression and function of Fas ligand of lacrimal glands and peripheral blood in Sjogren's syndrome patients with enlarged exocrine glands*. Clin. Exp. Immunol., 2002, 129, 177-182.
6. Strong B., Farley W., Stern M.E., Pflugfelder S.C.: *Topical cyclosporine inhibits conjunctival epithelial cells apoptosis in experimental murine keratoconjunctivitis sicca*. Cornea, 2005, 24, 80-5.
7. Brignole F., De Saint-Jean M., Goldschild M., Becquet F., Goguel A., Baudouin C.: *Expression of Fas-Fas ligand antigens and apoptotic marker APO2.7 by the human conjunctival epithelium. Positive correlation with class II HLA DR expression in inflammatory ocular surface disorders*. Exp. Eye Res., 1998, 67, 687-697.
8. Shakibaei M., Schultze-Tanzil G., Takada Y.: *Redox regulation of apoptosis by members of the superfamily*. Antioxid Redox Signal, 2005, 7, 482-496.
9. Limkemann A., Qian J., Lettau M.: *Considering Fas ligand as a target therapy*. Expert Opin. Ther. Target, 2005, 9, 119–34.
10. Mahovic D., Petracic D., Petelin Z., Zurak N., Horvat G., Hajnsek S.: *Level of sFas /APO 1 in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis*. Clin. Neurol. Neurosurg., 2004, 106, 230-232.
11. Tuominen I., Vesaluoma M., Teppo AM., Gronhagen-Riska C., Tervo T.: *Soluble Fas and Fas ligand in human tear fluid after photorefractive keratectomy*. Br. J. Ophthalmol., 1999, 83, 1360-1363.
12. Blancheteau V., Charron D., Mooney N.: *HLA class II signals sensitize B lymphocytes to apoptosis via Fas/CD95 by increasing FADD recruitment to activated Fas and activation of caspases*. Hum. Immunol., 2002, 63, 375–383.
13. Gottlieb RA, Dosanjh A.: *Mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits acidification and apoptosis in C127 cells: possible relevance to cystic fibrosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 3587-3591.
14. Maiuri L, Raia V, De Marco G.: *DNA fragmentation is a feature of cystic fibrosis epithelial cells: a disease with inappropriate apoptosis?*. FEBS, 1997, 408, 225-231.
15. Griffith TS, Brunner T, Flechter SM.: *Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune tolerance*. Science, 1995, 270, 1189–1192.
16. Brignole F, De Saint-Jean M., Goldschild M., Becquet F., Goguel A., Baudouin C.: *Expression of Fas-Fas ligand antigens and apoptotic marker APO2.7 by the human conjunctival epithelium. Positive correlation with class II HLA DR expression in inflammatory ocular surface disorders*. Exp. Eye Res., 1998, 67, 687-697.
17. De Saint Jean M, Brignole F, Feldmann G, Goguel A, Baudouin C.: *Interferon-γ induces apoptosis and expression of inflammation-related proteins in Chang conjunctival cells*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1999, 40, 2199-2212.
18. Yeh S., Song X.J., Farley W., Li D.-Q., Stern M.E., Pflugfelder S.C.: *Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2003, 44, 124-129.
19. Tsubota K., Fujita H., Tadano K., Onoda N., Tsuzaka K., Takeuchi T.: *Abnormal expression and function of Fas ligand of lacrimal glands and peripheral blood in Sjogren's syndrome patients with enlarged exocrine glands*. Clin. Exp. Immunol., 2002, 129, 177-182.

Praca wpłynęła do Redakcji 17.01.2006 r. (802)  
Zakwalifikowano do druku 20.12.2006 r.

Adres do korespondencji (reprint request to):  
dr n. med. Małgorzata Mrugacz  
Klinika Okulistyki Dziecięcej  
15-274 Białystok, ul. Waszyngtona 17

**Polskie Towarzystwo Okulistyczne**

**e-mail: [pto@pto.com.pl](mailto:pto@pto.com.pl)**

**[www.pto.com.pl](http://www.pto.com.pl)**